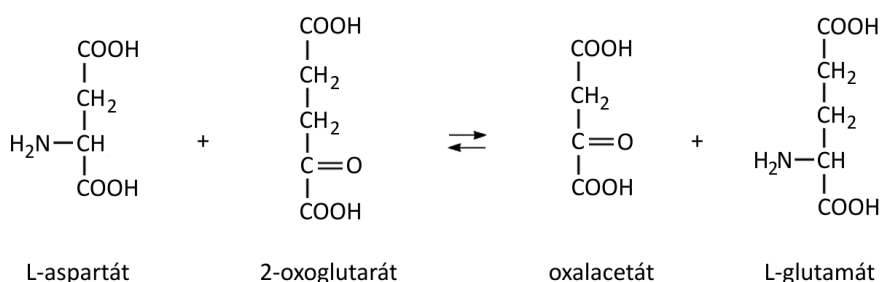


## Aspartátaminotransferáza (AST)

AST je buněčný enzym přítomný v řadě tkání, jako jsou srdce, kosterní svaly, ledviny, mozek, játra, pankreas či erythrocyty. Vyskytuje se ve dvou izoformách, cytoplazmatické a mitochondriální. Při poškození buňky se ve zvýšené míře do krve vyplavuje nejprve cytoplazmatický izoenzym, při těžkém poškození se v krvi zvyšuje i aktivita AST z mitochondrií. Stanovení aktivity AST v séru se využívá převážně k posouzení poškození jater.

AST katalyzuje následující reakci:



Referenční hodnoty:

Sérum:

	<b>MUŽI</b>	<b>ŽENY</b>
	0,17 – 0,85 μkat/l	0,17 – 0,60 μkat/l

Klinický význam:

**Zvýšení aktivity:**

poškození jater

*(akutní virová hepatitida, infekční mononukleóza, toxické poškození jater, alkohol-toxická hepatitida, sepse, dekompenzovaná jaterní cirhóza, metastázy do jater aj.)*

onemocnění žlučníku a žlučových cest

*(cholangitida, biliární kolika)*

onemocnění myokardu

*(akutní infarkt myokardu, operace srdce, resuscitace)*

onemocnění kosterního svalstva

*(časné stadium svalové dystrofie, zhmoždění svalů, dlouhotrvající fyzická námaha)*

Reyův syndrom, podání morfinu aj.

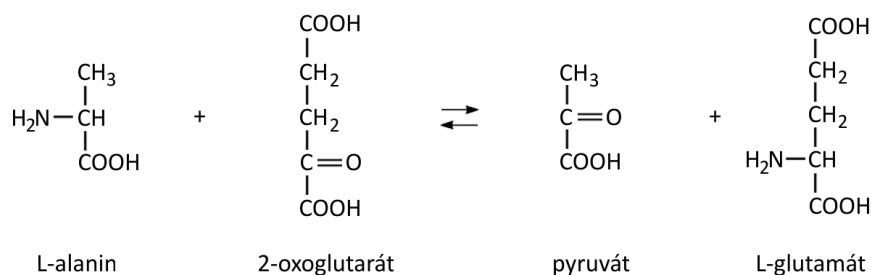
**Snížení aktivity:**

deficit vitamínu B<sub>6</sub>

## Alaninaminotransferáza (ALT)

ALT je cytoplazmatický enzym lokalizovaný především v hepatocytech. Při poškození buňky se vyplavuje ve zvýšené míře do krve. Stanovení aktivity ALT v séru se využívá převážně k posouzení poškození jater.

ALT katalyzuje následující reakci:



Referenční hodnoty:

Sérum:

	MUŽI	ŽENY
	0,17 – 0,83 μkat/l	0,17 – 0,58 μkat/l

Klinický význam:

**Zvýšení aktivity:**

poškození jater

*(akutní virová hepatitida, infekční mononukleóza, toxické poškození jater, alkohol-toxická hepatitida, sepse, dekompenzovaná jaterní cirhóza, metastázy do jater aj.)*

onemocnění žlučníku a žlučových cest

*(cholangitida, biliární kolika)*

onemocnění myokardu

*(srdeční selhání s městnáním krve v játrech)*

Reyův syndrom

terapeutická aplikace hovězího nebo prasečího heparinu aj.

**Snížení aktivity:**

deficit vitamínu B<sub>6</sub>

## PRAKTICKÁ ČÁST

### ÚKOL: STANOVENÍ AKTIVITY AMINOTRANSFERÁZ AST A ALT V KREVNÍM SÉRU

#### PRINCIP METODY

Stanovení je založeno na měření absorbance hydrazonů 2-oxoglutarátu a pyruvátu v alkalickém prostředí.

AST katalyzuje přenos aminoskupiny z L-aspartátu na 2-oxoglutarát za vzniku oxalacetátu a L-glutamátu. Vzniklý oxalacetát v silně kyselém prostředí spontánně dekarboxyluje za vzniku pyruvátu.

ALT katalyzuje přenos aminoskupiny z alaninu na 2-oxoglutarát za vzniku pyruvátu a L-glutamátu.

Přírůstek pyruvátu s časem je mírou aktivity AST, ALT. Koncentrace pyruvátu se stanovuje spektrofotometricky ve formě hydrazonu, který vzniká reakcí s 2,4-dinitrofenylhydrazinem v alkalickém prostředí. Stanovení využívá toho, že hydrazon pyruvátu absorbuje mnohem více při 510 nm než hydrazon 2-oxoglutarátu.

#### POMŮCKY A PŘÍSTROJE

diagnostické soupravy řady BIO-LA-TEST pro stanovení ALT, AST (Erba Lachema s.r.o.), zkumavky, pipeta dělená, pipeta automatická, pipetovací nástavec, kyveta, spektrofotometr SPEKOL 1300

#### CHEMIKÁLIE

standardní roztok (2 mmol/l pyrohroznán sodný)

2,4-dinitrofenylhydrazin (2,4-DNPH; 1mmol/l roztok v 1 mol/l HCl)

hydroxid sodný

substrát AST (0,1 mol/l L-aspartát; 2 mmol/l 2-oxoglutarát; 0,1 mol/l fosfátový pufr pH 7,4)

substrát ALT (0,2 mol/l DL- $\alpha$ -alanin; 2 mmol/l 2-oxoglutarát; 0,1 mol/l fosfátový pufr pH 7,4)

fyziologický roztok (0,9 % NaCl)

## POSTUP

1. Pipetujte do označených zkumavek dle následující tabulky.

	<b>VZOREK</b> zkumavka 1	<b>BLANK</b> zkumavka 2
<b>substrát AST/substrát ALT</b>	<b>250 µl</b>	<b>250 µl</b>
<b>fyzilogický roztok</b>	—	<b>50 µl</b>
<i>Promíchejte a 3 minuty preinkubujte při 37 °C. Poté přidejte:</i>		
<b>vzorek (krevní sérum)</b>	<b>50 µl</b>	—
<i>Promíchejte a přesně 60 minut inkubujte při 37 °C. Poté přidejte:</i>		
<b>2,4-DNPH</b>	<b>250 µl</b>	<b>250 µl</b>
<i>Promíchejte a nechte stát 20 minut při laboratorní teplotě. Poté přidejte:</i>		
<b>roztok NaOH</b>	<b>2,5 ml</b>	<b>2,5 ml</b>
<i>Promíchejte a 10 minut inkubujte při laboratorní teplotě.</i>		
<i>Poté odečtěte absorbanci vzorku při 510 nm proti blanku.</i>		

KALIBRACE

roztok		1	2	3	4	5
<b>výsledná katalytická koncentrace</b>	( $\mu\text{kat/l}$ )	0,00	0,28	0,56	0,83	1,11

1. Pipetujte do označených zkumavek jednotlivé roztoky v uvedeném pořadí dle následující tabulky.

roztok		1	2	3	4	5
<b>fyzilogický roztok</b>	(ml)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
<b>substrát AST/ALT</b>	(ml)	0,50	0,45	0,40	0,35	0,30
<b>standardní roztok</b>	(ml)	—	0,05	0,10	0,15	0,20
<b>2,4-DNPH</b>	(ml)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50

*Promíchejte a po 20 minutách přidejte:*

<b>roztok NaOH</b>	(ml)	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
--------------------	------	------	------	------	------	------

*Promíchejte a 10 minut inkubujte při laboratorní teplotě.*

*Poté odečtěte absorbance roztoků č. 2 – 5 při 510 nm proti roztoku č. 1.*

- Naměřené hodnoty zapište do předem připravené tabulky.
- Sestrojte kalibrační graf závislosti absorbance na katalytické koncentraci.

NAMĚŘENÉ HODNOTY**KALIBRAČNÍ KŘIVKA**

absorbance (A)	katalytická koncentrace ( $\mu\text{kat/l}$ )
	0,00
	0,28
	0,56
	0,83
	1,11

**TESTOVANÝ VZOREK**

absorbance (A)	katalytická koncentrace ( $\mu\text{kat/l}$ )

GRAFICKÉ VYJÁDŘENÍVYHODNOCENÍ